

Cara uji mikrobiologi–Bagian 7: Perhitungan kapang dan khamir pada produk perikanan



© BSN 2009

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Mangala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip.....	1
4 Peralatan	2
5 Media dan pereaksi	2
6 Kondisi	2
7 Prosedur	2
8 Perhitungan koloni.....	3
9 Pelaporan	4
10 Keamanan dan keselamatan kerja	4
Lampiran A (normatif) Pembuatan media.....	6
Lampiran B (normatif) Pembuatan pereaksi.....	7
Lampiran C (normatif) Larutan standar kloramfenikol	8
Lampiran D (normatif) Skema perhitungan kapang dan khamir pada produk perikanan	9
Bibliografi.....	10

Prakata

Dalam rangka memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan terhadap komoditas produk perikanan yang akan dipasarkan di dalam dan luar negeri, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang metode uji yang dapat memenuhi jaminan tersebut.

Standar ini merupakan revisi dari SNI 01-2342-1991 dan disusun oleh Panitia Teknis 65-05 Produk Perikanan. Standar ini dirumuskan melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 21 Desember 2006 di Bogor serta dihadiri oleh anggota panitia teknis, wakil-wakil produsen, konsumen, asosiasi, lembaga penelitian, perguruan tinggi serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan pangan.

Berkaitan dengan penyusunan Standar Nasional Indonesia ini, maka aturan-aturan yang dijadikan dasar atau pedoman adalah:

1. Undang-Undang No 31 tahun 2004 tentang Perikanan.
2. Peraturan Pemerintah No. 69 tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 01/MEN/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 06/MEN/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 21/MEN/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 16 Juli 2007 sampai dengan 16 Oktober 2007 dan pemungutan suara pada tanggal 21 Oktober 2008 sampai dengan 21 Januari 2009 dengan hasil akhir RASNI.

Cara uji mikrobiologi – Bagian 7: Perhitungan kapang dan khamir pada produk perikanan

1 Ruang lingkup

Standar ini digunakan untuk menentukan jumlah total mikroorganisme aerob pada produk perikanan.

2 Istilah dan definisi

2.1

kapang

mikroba terdiri lebih dari satu sel berupa benang-benang halus yang disebut hifa, kumpulan hifa disebut miselium, berkembang biak dengan spora

2.2

khamir

mikroba bersel tunggal berbentuk bulat lonjong dan memperbanyak diri melalui pembentukan tunas atau askospora, tetapi tidak membentuk miselium

2.3

inkubasi

pengkondisian pertumbuhan mikroorganisme pada suhu dan waktu yang optimum

2.4

koloni

kumpulan sel mikroba yang tumbuh pada media agar dan dapat dilihat secara visual

2.5

mikroorganisme

kelompok organisme yang berukuran kecil dan hanya dapat dilihat di bawah mikroskop

2.6

media agar

media padat yang digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme

2.7

produk perikanan

ikan termasuk biota perairan lainnya yang ditangani dan/atau diolah untuk dijadikan produk akhir yang berupa ikan segar, ikan beku dan bahan olahan lainnya yang digunakan untuk konsumsi manusia

3 Prinsip

Pertumbuhan mikroorganisme aerob setelah contoh diinkubasikan dalam media agar pada suhu 22 °C - 25 °C selama 5 hari. Penentuan jumlah kapang dan khamir dilakukan dengan dua cara: pertama metoda cawan agar tuang (*pour plate*) kedua metode cawan agar sebar (*spread plate*).

4 Peralatan

- a) alat penghitung koloni;
- b) *autoclave*;
- c) batang gelas bengkok diameter 3 mm – 4 mm, dengan panjang tangkai 15 cm - 20 cm;
- d) botol pengencer 20 ml;
- e) cawan petri 15 mm x 90 mm;
- f) erlenmeyer;
- g) inkubator suhu 22 °C - 25 °C;
- h) pipet : 0,1 ml, 1 ml, 5 ml dan 10 ml;
- i) *stomacher*;
- j) timbangan dengan ketelitian 0,01 g.

5 Media dan pereaksi

- a) *Potato Dextrose Agar*, sesuai Lampiran A;
- b) Larutan *Butterfield's phosphate buffered*, sesuai Lampiran B;
- c) Larutan standar, sesuai Lampiran C.

6 Kondisi

Kondisi media agar yang akan dituang mempunyai suhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

7 Prosedur

7.1 Preparasi contoh

Contoh yang akan diuji diambil secara aseptik dan acak dengan ketentuan berat sebagai berikut :

- a) contoh dengan berat kurang dari 1 kg, diambil sebanyak 100 g.
- b) contoh dengan berat 1 kg - 4,5 kg, diambil sebanyak 300 g.
- c) contoh dengan berat lebih dari 4,5 kg, diambil sebanyak 500 g.

7.2 Homogenasi dan pengenceran

- a) timbang contoh secara aseptik sebanyak 25 g untuk contoh (a) dan (b) dan 50 g untuk contoh (c) di atas, kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril.
- b) tambahkan larutan *butterfield's phosphate buffered* sebanyak 225 ml untuk contoh 25 g dan 450 ml untuk contoh 50 g, homogenkan selama 2 menit. Homogenat ini merupakan larutan pengenceran 10^{-1} .
- c) dengan menggunakan pipet steril, ambil 1 ml homogenat diatas dan masukkan ke dalam 9 ml larutan *butterfield's phosphate buffered* untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} .
- d) siapkan pengenceran selanjutnya (10^{-3}) dengan mengambil 1 ml contoh dari pengenceran 10^{-2} ke dalam 9 ml larutan *butterfield's phosphate buffered*.
- e) pada setiap pengenceran dilakukan pengocokan minimal 25 kali. Selanjutnya lakukan hal yang sama untuk pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} dan seterusnya sesuai kondisi contoh.

7.3 Metoda cawan agar tuang (*pour plate method*)

- pipet 1 ml dari setiap pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dst dan masukkan ke dalam cawan petri steril. Lakukan secara duplo untuk setiap pengenceran.
- tambahkan 15 ml - 20 ml PDA yang sudah didinginkan dalam *waterbath* hingga mencapai suhu $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan yang sudah berisi contoh. Supaya contoh dan media PDA tercampur sempurna lakukan pemutaran cawan ke depan ke belakang dan ke kiri-ke kanan.
- setelah agar menjadi padat, untuk penentuan mikroorganisme aerob inkubasi cawan-cawan tersebut dalam posisi terbalik dalam inkubator pada suhu 22°C - 25°C selama 5 hari.
- lakukan kontrol tanpa contoh dengan mencampur larutan pengencer dengan media PDA.

7.4 Metoda cawan agar sebar (*spread plate method*)

- tuang 15 ml - 20 ml PDA ke dalam cawan-cawan petri steril dan dinginkan. Pipet 0,1 ml dari setiap pengenceran (10^{-1} , 10^{-2} , dst) ke dalam cawan petri yang telah berisi media PDA di atas dan ratakan dengan menggunakan batang gelas bengkok. Lakukan secara duplo untuk setiap pengenceran.
- supaya contoh meresap ke dalam media agar diamkan sekurang-kurangnya 1 jam. Untuk penentuan mikroorganisme aerob inkubasi cawan-cawan tersebut dalam posisi terbalik dalam inkubator pada suhu 22°C - 25°C selama 5 hari.
- lakukan kontrol tanpa contoh dengan mencampur larutan pengencer dengan media PDA.

8 Perhitungan koloni

8.1 Hitung cawan yang mengandung jumlah 10 koloni - 150 koloni dan catat pengenceran yang digunakan.

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times (d)}$$

dengan:

- N : jumlah koloni produk, dinyatakan dalam koloni per ml atau koloni per g;
 $\sum C$: jumlah koloni pada semua cawan yang dihitung;
 n_1 : jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung;
 n_2 : jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung;
 d : pengenceran pertama yang dihitung.

CONTOH:

Pengenceran :	1: 100	1: 1000
Jumlah koloni :	132 dan 144	23 dan 18

$$\begin{aligned}
 N &= \frac{(132 + 144 + 23 + 18)}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} \\
 &= 317/0,022 \\
 &= 14.409 \\
 &= 14.000 \text{ koloni per g}
 \end{aligned}$$

8.2 Hitung cawan yang mengandung jumlah koloni lebih dari 150 koloni dan catat pengenceran yang digunakan.

SNI 2332.7:2009

Bila jumlah koloni per cawan lebih dari 150 pada seluruh pengenceran maka laporkan hasilnya sebagai terlalu banyak untuk dihitung (TBUD), tetapi jika salah satu pengenceran mempunyai jumlah koloni mendekati 150 laporkan sebagai perkiraan kapang dan khamir.

CONTOH:

Pengenceran	: 1 : 100	1 : 1000
Jumlah koloni	: TBUD	170
Perkiraan ragi dan kapang koloni per ml atau per g	: 170.000	

8.3 Hitung cawan yang mengandung jumlah koloni kurang dari 10 koloni atau cawan tanpa koloni dan catat pengenceran yang digunakan.

Bila pada kedua pengenceran yang digunakan diperoleh koloni kurang dari 10, catat koloni yang ada, nyatakan perhitungan sebagai kurang dari 10 dan dikalikan dengan 1/d, dimana d adalah faktor pengenceran pertama yang digunakan dan dilaporkan sebagai perkiraan ALT kapang dan khamir.

CONTOH:

Pengenceran:	1 : 100	1 : 1000
Jumlah koloni:	8 dan 0	2 dan 0
Perkiraan ALT ragi dan kapang koloni per ml atau koloni per g:	lebih kecil dari 1400	

9 Pelaporan

- Untuk menghasilkan perhitungan yang akurat dan teliti, maka laporkan hasilnya dengan dua angka (digit) pertama sebagai hasil pembulatan.
- Bulatkan ke atas dengan cara menaikkan angka kedua menjadi angka yang lebih tinggi bila angka ketiga adalah 6, 7, 8 atau 9 dan gunakan angka 0 untuk masing-masing angka pada digit berikutnya.
- Bulatkan ke bawah bila angka ketiga adalah 1, 2, 3 atau 4. Bila angka ketiga 5, bulatkan ke atas bila angka kedua ganjil dan bulatkan ke bawah bila angka kedua itu genap.

CONTOH:

Hasil perhitungan	ALT
12.700	13.000
12.400	12.000
15.500	16.000
14.500	14.000

Beri tanda bintang (*) untuk cawan yang kurang dari 10 koloni.

CONTOH:

Pengenceran:	1 : 100	1 : 1000
Jumlah koloni:	8 dan 0	2 dan 0
Perkiraan ALT koloni per ml atau koloni per g:	lebih kecil dari 1.400*	

10 Keamanan dan keselamatan kerja

Untuk menjaga keamanan dan keselamatan kerja selama melakukan analisa maka perlu diperhatikan hal-hal sebagai berikut:

- cuci tangan sebelum dan sesudah melakukan analisa.
- gunakan jas laboratorium selama melakukan analisa.
- lakukan ketuk setiap tahapan analisa secara aseptis.

- d) bersihkan meja kerja sebelum dan sesudah melakukan analisa.
- e) bersihkan segera contoh yang tercecer dan mengandung bakteri dengan menggunakan bahan desinfektan.
- f) media yang sudah digunakan disterilkan terlebih dahulu sebelum dibuang.



Lampiran A
(normatif)
Pembuatan media

A.1 *Potato Dextrose Agar*

<i>Potato Infusion</i>	200 ml
<i>Dextrose</i>	20 g
Agar	20 g
Akuades	1 l

Panaskan seluruh bahan tersebut hingga mendidih. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

Sebelum media agar (PDA) digunakan tambahkan 10 ml larutan standar kloramfenikol (1 %) ke dalam 990 ml larutan PDA.



Lampiran B
(normatif)
Pembuatan pereaksi

B.1 Larutan *Butterfield's phosphate buffered*

a) Larutan stok:

KH_2PO_4	34 g
Akuades	500 ml

Atur pH 7.2 dengan 1 N NaOH. Tepatkan volume larutan tersebut hingga 1 l dengan penambahan akuades. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C. Simpan dalam *refrigerator*.

b) Larutan kerja :

Pipet 10 ml larutan stok dan tepatkan hingga 1 l dengan penambahan akuades. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121 °C.



Lampiran C
(normatif)
Larutan standar kloramfenikol

Untuk menghambat pertumbuhan bakteri digunakan larutan standar antibiotik seperti kloramfenikol.

Larutan standar :

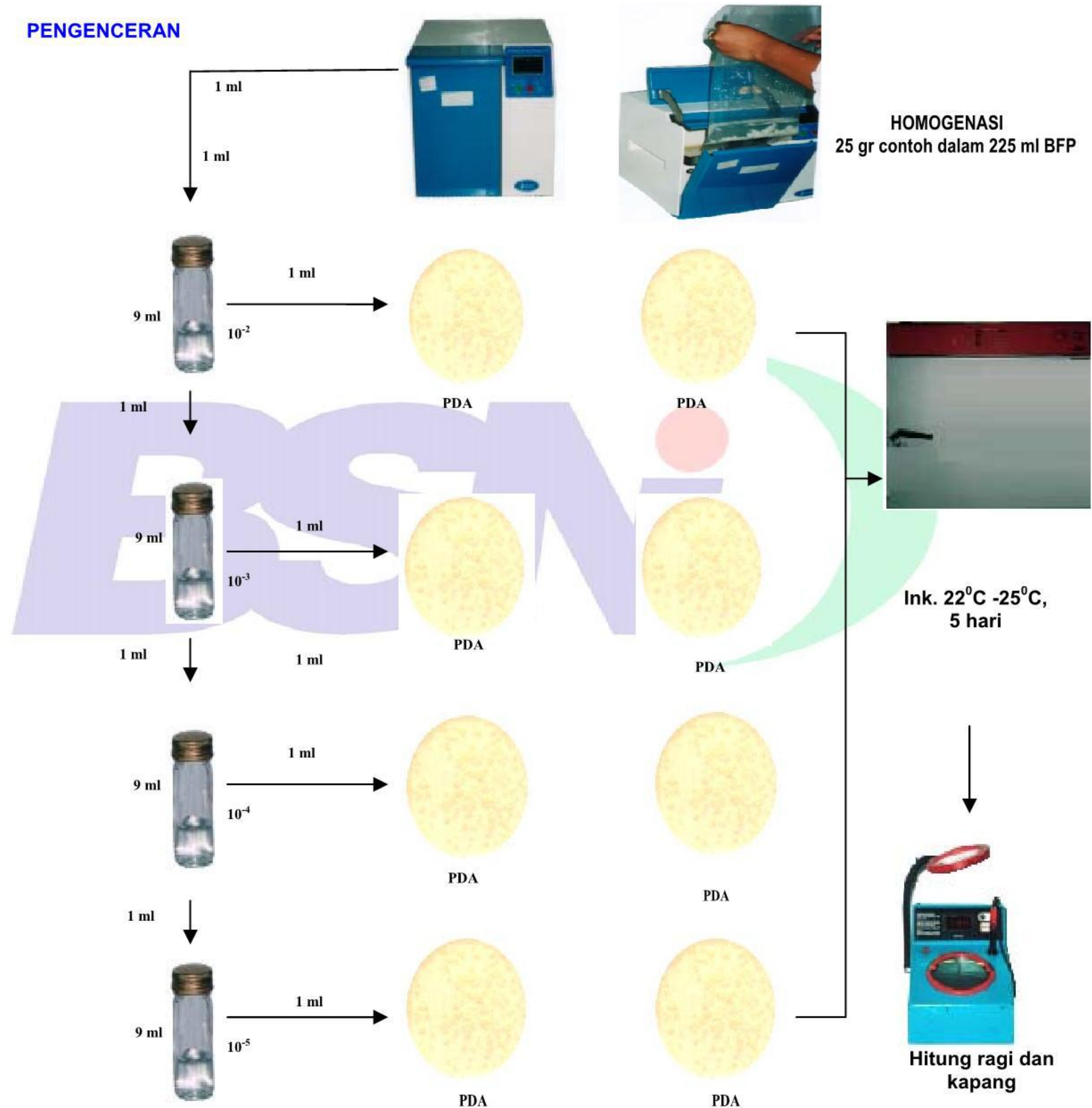
Kloramfenikol 0,1 g
Akuades 10 ml
Larutkan 0,1 g kloramfenikol ke dalam 10 ml akuades.

Larutan kerja :

Tambahkan 10 ml larutan standar kloramfenikol ke dalam 990 ml larutan PDA (*Potato Dextrose Agar*)



Lampiran D
(normatif)
Skema perhitungan kapang dan khamir pada produk perikanan



Gambar 1 – Skema perhitungan kapang dan khamir pada produk perikanan

Bibliografi

AOAC, 2000, *Official Methods of Analysis*, 17th.

Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. 8th edition 1998. Chapter 18. AOAC International.

Official Chemical Method, 1979. *Fish Inspection Branch Fisheries*. And Ocean Canada.







BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id